动 物 学 研 究 2008，Aug. 29(4)：353-362 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research doi:10.3724/SP.J.1141.2008.04353

# 北京油鸡 ADSL 基因的克隆、表达及其结构与功能分析

刘长青[1,2]，刘 帅[1,3]，包阿东[1,3]，陆涛峰[1]，吴宏梅[1]，
张洪海[4]，唐学玺[2]，关伟军[1,*]，马月辉[1,*]

(1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，北京 100094；2. 中国海洋大学 海洋生命学院，青岛 266003；
3. 内蒙古农业大学 动物科学与医学学院，呼和浩特 010018； 4. 曲阜师范大学 研究生处，曲阜 273165)

**摘要**：采用 RT-PCR 与 RACE 方法扩增出北京油鸡腺苷酸琥珀酸裂解酶（ADSL）基因全长 cDNA 序列，亚克隆和序列分析结果表明：该基因开放阅读框长为 1455 个碱基，编码 485 个氨基酸；5′端非转录调控区具有典型管家基因的特征，在临近起始密码子－27 号碱基发生 C→T 突变，该突变使得本来不是核呼吸因子 2（NRF-2）结合位点的 CTCC 突变为 NRF-2 结合位点 CTTC。将 ADSL 基因完整开放阅读框重组至融合表达载体 pGEX-4T-1 中，构建成北京油鸡 ADSL 基因融合表达载体 pGEX-ADSL，转化大肠杆菌 BL21（DE3）, 筛选阳性克隆，IPTG 诱导表达。经 SDS-PAGE 电泳显示重组融合蛋白在约 80.5 kD 处有特异蛋白条带出现，与预期分子量大小一致，等电点为 6.79。该蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加，5 h 达最高值，达到细胞总蛋白的 26.9%，且主要以不可溶的包涵体形式存在，经优化表达条件，成功地获得了可溶性的融合蛋白，经 Glutathione Sepharase 4B 凝胶纯化后 Western blotting 检测表明其为北京油鸡 ADSL 蛋白，为其进一步的生物学功能及其应用研究鉴定基础。

**关键词**：北京油鸡；腺苷酸琥珀酸裂解酶；结构分析；基因表达
**中图分类号**：Q344.13; Q786; Q959.725 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2008)04-353-010

# Molecular Clone, Expression, Structure and Function Study of Beijing Fatty Chicken ADSL Gene

LIU Chang-qing[1,2], LIU Shuai [1,3], BAO A-dong[1,3], LU Tao-feng[1],WU Hong-mei[1],
ZHANG Hong-hai[4], TANG Xue-xi[2], GUAN Wei-jun[1,*]， MA Yue-hui[1,*]

(1. *Institute of Animal Science，Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100094, *China*；
2. *Division of Life Science and Technology, Ocean University of China*，*Qingdao* 266003, *China*；
3. *College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot* 010018, *China;*
4. *Graduate Department, Qufu Normal University, Qufu* 273165, *China*)

**Abstract:** The full-length of the cDNA sequence of Beijing fatty chicken ADSL gene was investigated by RT-PCR and RACE in this study. The results demonstrated that the complete ADSL cDNA revealed an open reading frame of 1455 nucleotides coding for 485 amino acid residues. The promoter of chicken ADSL cDNA showed typical features of house-keeping genes: no canonical TATA and CAAT boxes, 72.65% GC in 234 bp near the start codon, and there was a C-27T mutation, which caused the site CTCC mutating to the NRF-2 binding site CTTC. The complete open reading frame of the ADSL gene was inserted into expression vector pGEX-4T-1 and the fusion expression vector pGEX-ADSL was constructed. The pGEX-ADSL was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), positive cloning screened, induced and expresses by IPTG. The SDS-PAGE electrophoresis results showed that there were specific bands, about 83.5 kD and an isoelectric point of 6.79, which reached 26.9% of total cell proteins induced in 5hrs, and was an insoluble inclusion body. Under optimal conditions, ADSL was purified by Glutathione Sepharase 4B affinity chromatography, and Western blotting analysis showed that the fused protein was ADSL. This research was a foundation for further research into ADSL's biological function and its application identification.

收稿日期：2008-03-11；接受日期：2008-06-02
基金项目：国家"863"计划项目资助（2006AA10Z198；2007AA10Z170）
*通讯作者（Corresponding authors）：关伟军（1966-），男，教授，博士生导师，主要从事动物细胞分子生物学方面研究工作，Tel：010-62815992，E-mail: wjguan86@iascaas.net.cn；马月辉（1964-），男，研究员，博士生导师，主要从事动物遗传资源保护方面研究工作，Tel：010-62813463，E-mail: yuehui_ma@263.net
第一作者简介：刘长青（1978- ），男，博士生，主要从事分子细胞生物学研究工作

**Key words**：Beijing fatty chicken; Adenylosuccinate lyase; Structure analysis; Gene expression

随着人们生活水平的提高以及营养和健康意识的增强，人们对畜禽肉质风味的要求亦越来越高。因此改善和提高畜禽肉质风味的研究是新时期育种学家所面临的严峻挑战。前人有关北京油鸡、石歧杂鸡和黄羽鸡等肌肉中化学成分的研究结果表明：氨基酸、肌内脂肪酸（intramuscular fat，IMF）和（inosinic acid，IMP）是影响肌肉风味的主要因素(Blackburn et al, 1998; Chen et al, 2000; Chen et al, 2002)。其中，IMP 合成酶系中至关重要的腺苷酸琥珀酸裂解酶（ADSL）是催化嘌呤核苷酸起始合成与循环的唯一双功能酶(Castro et al, 2002; Van den Bergh et al, 1993)。

自从 Jaeken & Van den Bergh(1984)发现第一个 ADSL 缺陷病人开始，至今已经发现有 50 多处有致病作用的 ADSL 基因的点突变。所以当前国内外对影响肌苷酸生成的关键限速酶 ADSL（adenylosuccinate lyase）基因的研究还主要集中在病理、生理、免疫等领域，而将其作为影响肉质风味重要性状肌苷酸含量的研究尚未见报道(Van den Bergh et al, 1997; Vergis et al, 2001; Bulock et al, 2002)。

谷胱甘肽 S-转移酶（Glutathions S-transferase，GST）融合表达系统 pGEX-4T-1 是目前广泛使用的融合蛋白表达载体之一，该系统是将 GST 基因与目的基因相连，所产生的融合蛋白经 Glutathion Sepharase 4B 凝胶亲和纯化后切除 GST 而获得目的蛋白，目前已有很多蛋白在 pGEX 载体中得到有效表达和纯化(Smith et al, 1988)。本研究在利用 RT-PCR 与 RACE 技术获得北京油鸡 ADSL 基因全长 cDNA 序列的基础上，将其重组至 pGEX-4T-1 表达载体中构建原核融合高效表达载体 pGEX-ADSL，在大肠杆菌（BL21）中得到高效可溶性表达，得到以 pGEX-ADSL 可溶性表达为主的基因工程菌，并对其结构和功能进行预测分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 北京油鸡 30 日龄北京油鸡种鸡取自中国农业科学院北京畜牧兽医研究所种鸡养殖场。

1.1.2 质粒与菌株 pGEX-4T-1 载体为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品，pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司，大肠杆菌 DH5α、表达宿主菌 BL21(DE3)为本实验室保存。

1.1.3 主要试剂 RNA 提取 Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司；QIAquick Gel Extraction kit 凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司，cDNA 合成试剂盒、cDNA PCR 文库构建试剂盒、LA Taq$^{TM}$ PCR 扩增试剂盒、5′-Full RACE 试剂盒、LA PCR$^{TM}$ *in vitro* 克隆试剂盒等购自 TaKaRa 宝生物工程公司；pGEM-T Easy Vector、M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司；EcoR I、Xho I 内切核酸酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 的抽提 取新鲜北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌等不同组织 100mg，按照 Invitrogen 公司 RNA 提取 Trizol 试剂盒使用说明提取北京油鸡总 RNA，利用紫外分光光度计及 RNA 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳对 RNA 的质量进行检测分析。

1.2.2 北京油鸡 ADSL 基因 cDNA 全序列的扩增与 3′、5′RACE 3′末端的克隆：利用特异引物 ADSL 31（5′-CAG ATT GGC TCM AGT GCG-3′）和 cDNA 合成试剂盒对应接头引物 RA（5′-CTG GCG TAC CGC GAC ACC-3′）对 cDNA PCR 文库进行第一次扩增，再用 ADSL 32（5′-GCC ACA GAG AAC ATC ATC AT-3′）和 RA 引物采用半巢式 PCR（semi-nested PCR），进行第二次扩增 ADSL 基因 cDNA 序列的 3′端；5′末端的克隆：通过引物 ADSL 51（5′-CAC AAG CAG CAG CGT TTC C-3′），ADSL 52（5′-CTG GCG TAC CGC GAC ACC-3′）与 5′-Full RACE 试剂盒引物 S1，S2 做巢式 PCR 扩增其 5′端序列；中间序列的克隆：用特异引物 ADSL Z1（5′-CTG GTG TCG CGG TAC GCC-3′），ADSL Z2（5′-ATG ATG ATG TTC TCT GTG GC-3′）扩增中间序列。

1.2.3 引物设计与北京油鸡 ADSL 基因成熟肽片段的获得 在克隆测序北京油鸡 ADSL 基因全长 cDNA 序列的基础上，根据 ADSL 基因序列和 pGEX-4T-1 多克隆位点的序列设计了一对特异性引物来扩增北京油鸡 ADSL 基因的成熟蛋白。设计的特异性引物为：ADSLF1（5′-*GAA TTC* ATG GCG ACC CCC TGC GCC GAG GA-3′），ADSLR1（5′

-*CTC GAG TTA* AAG TGT CAG CTC AAT TTT C-3′），在北京油鸡 ADSL 基因起始密码子 ATG 前面，加入了 *Eco*R I 酶切位点 *GAATTC*，3′端引物在原有的终止密码 TAA 后面加入了 *Xho* I 酶切位点 *CTCGAG*。

1.2.4　ADSL 基因 5′侧翼调控区的研究　提取北京油鸡基因组 DNA，利用限制性内切酶 *Hin*d III对其进行充分酶切，根据 LA PCR$^{TM}$ *in vitro* 克隆试剂盒使用说明将回收的酶切 DNA 连接 *Hin*d III接头，并组合使用 ADSL 基因的 5′端的特异引物 ADSL D1（5′-GTA GCG GGC CAG CGG GTC CT-3′），ADSL D2（5′-GCC AGC GGG TCC TCC TCG-3′）和试剂盒接头引物(Primer C1, Primer C2)进行 ADSL 基因 5′侧翼调控区序列的巢式 PCR 扩增。

1.2.5　北京油鸡 ADSL 基因组织差异表达研究　采用 RT-PCR 方法，检测北京油鸡 ADSL 基因在不同组织中的转录表达。将提取北京油鸡心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌和胸肌等组织的总 RNA，反转录为 cDNA 第一链，作为 RT-PCR 的模板。用引物 GAPDH F1: (5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′) 和 GAPDH R1:(5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′) 扩增 GAPDH 作为 RT-PCR 内参照,调整各样品模板浓度。在相同模板量的前提下，用 ADSL 特异性引物 ADSL F1/ADSL R1 对样品进行扩增，检测 ADSL 在各个组织中的表达。

1.2.6　北京油鸡 ADSL 基因表达载体的构建　将获得的 ADSL 基因全编码区 PCR 产物回收纯化后连接 pGEM-T Easy 载体，转化感受态大肠杆菌 DH5α，蓝白斑和 PCR 法筛选重组子 pGEM-T-ADSL，进行序列测定。纯化 pGEM-T-ADSL 重组载体，使用 *Eco*R I 与 *Xho* I 双酶切，回收长度约为 1400 bp 目的 DNA 片段。同时用 *Eco*R I 与 *Xho* I 酶切 pGEX-4T-1 载体，并进行脱磷酸化处理。将回收目的 DNA 定向插入处理的 pGEX-4T-1 载体中，构建融合表达载体 pGEX-ADSL，转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3)，PCR 筛选重组子，测序鉴定插入 DNA 片段的基因序列及插入方向。

1.2.7　重组北京油鸡 ADSL 的表达及 SDS-PAGE 分析　将含 pGEX-ADSL 重组质粒的 BL21 菌株接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37℃振荡培养过夜，次日 1∶100 扩大培养至 $OD_{600}$=0.5－0.8。添加 IPTG 至终浓度 0.1、1 mmol/L，诱导培养时间分别为 10、2、3、4 和 5 h，分别记录 OD 值。离心收集菌体，上清和沉淀加入 1×SDS 上样缓冲液，煮沸离心后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测表达情况，分析蛋白表达含量。

1.2.8　重组北京油鸡 GST-ADSL 融合蛋白的纯化　将 1 L 培养过夜的转化子菌液经 IPTG(0.1 mmol/L)诱导 3—5 h，离心收集菌体，用灭菌的 PBS 悬浮菌体，离心弃上清，重复 3 次，超声波破碎，最后 4℃下，12000 r/min 离心 10 min，收集上清液，即为可溶性融合蛋白，取上清液 100 μL 加入等体积 1×SDS 上样缓冲液混匀，沸水浴 10 min，进行 SDS-PAGE 电泳分析。将上清与 GSH Sepharase 4B 凝胶温育 30 min。将此混合物移至层析柱中，PBS（pH7.3）洗两遍后用 Elution buffer 20℃振荡洗脱，获得纯化的 GST-ADSL 融合蛋白。

1.2.9　Western blotting 检测融合蛋白　取 20 μL 对照（空载体表达产物）与纯化融合蛋白于 12%的 SDS-PAGE 电泳，电泳后将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至 PVDF 膜，将膜室温封闭 2 h，加入 GST 抗体 1∶1000 的一抗溶液，4℃，2 h。再加入二抗溶液（HRP 标记的羊抗鼠 IgG 1∶400），37℃，1 h，DAB 显色后与 Marker 进行比对鉴定纯化产物。

1.2.10　生物信息学分析　利用 DNAstar 的 Clustal W 程序进行氨基酸序列多重比对分析。用 MEGA3 软件将核苷酸序列逆翻译成的氨基酸序列，对推导出的蛋白序列使用蛋白质专家分析系统（http://au.expasy.org/tools/protparam.html）进行蛋白理化特性预测。蛋白质二级结构利用 PHDsec 程序进行预测(Rost, 1996)，三级结构在 Swiss-Model 蛋白质模型服务器上利用 Promod II 和 3D PSSM 程序进行预测(Kelley et al, 2000)。

## 2　结　果

### 2.1　北京油鸡 ADSL 全长 cDNA 的克隆及序列测定

本研究通过合成北京油鸡 5 个个体 cDNA 作为模板，每个个体序列重复测定 2 次，存在个别核苷酸差异根据多数原则。3′-RACE 扩增 ADSL 基因 cDNA 序列的 3′端序列为 406 bp；5′-RACE 特异引物 ADSL 51，ADSL 52 与 5′-Full RACE 试剂盒引物 S1, S2 做巢式 PCR 扩增其 5′端序列为 125 bp，用特异引物 ADSL 51，ADSL 52 扩增中间序列为 1112 bp。根据测序得出的三部分序列，拼接起全长为 1558 bp 的 ADSL 基因 cDNA 序列(提交 GenBank

编号 EU049886）。利用 Blastn 软件进行同源性基因检索，结果在 GenBank/EMBL/DDBJ/PDB 数据库中与家鼠(Wong et al, 1995)、人类(Marie et al, 1999)和犬分别具有 82、78 和 80%的一致性。利用 NCBI 与 DNAstar 软件提供的 ORF 进行开放阅读框的判定,从+1 到 1455 为完整阅读框，编码 485 个氨基酸，其预测蛋白的分子量（MW）约为 54.5kD，等电点为 6.79，具有 27bp 的 5′非翻译区（untranslated region,UTR）和 55bp 的 3′UTR，在 3′UTR 距离 Poly A 尾 14 核苷酸处，出现大多数真核生物共有的 AATAAA 转录终止信号（图 1）。

## 2.2　5′侧翼调控区分析

使用 ADSL 基因的 5′端的特异引物和试剂盒接头引物扩增出 1 035 bp 的 ADSL 基因 5′侧翼调控区序列。通过 TRANSFAC 转录因子数据库与 Neural Networks Promoter Prediction 预测，北京油鸡 ADSL 基因 5′侧翼调控区具有一些典型的调控元件，例如：Oct-1，Ap-2，GC-box，NF-AT，Sp1 和 NRF-2 等。但并没有明显的 TATA 和 CAAT 框出现，而且在位于临近起始密码子“ATG”前 234 bp 的

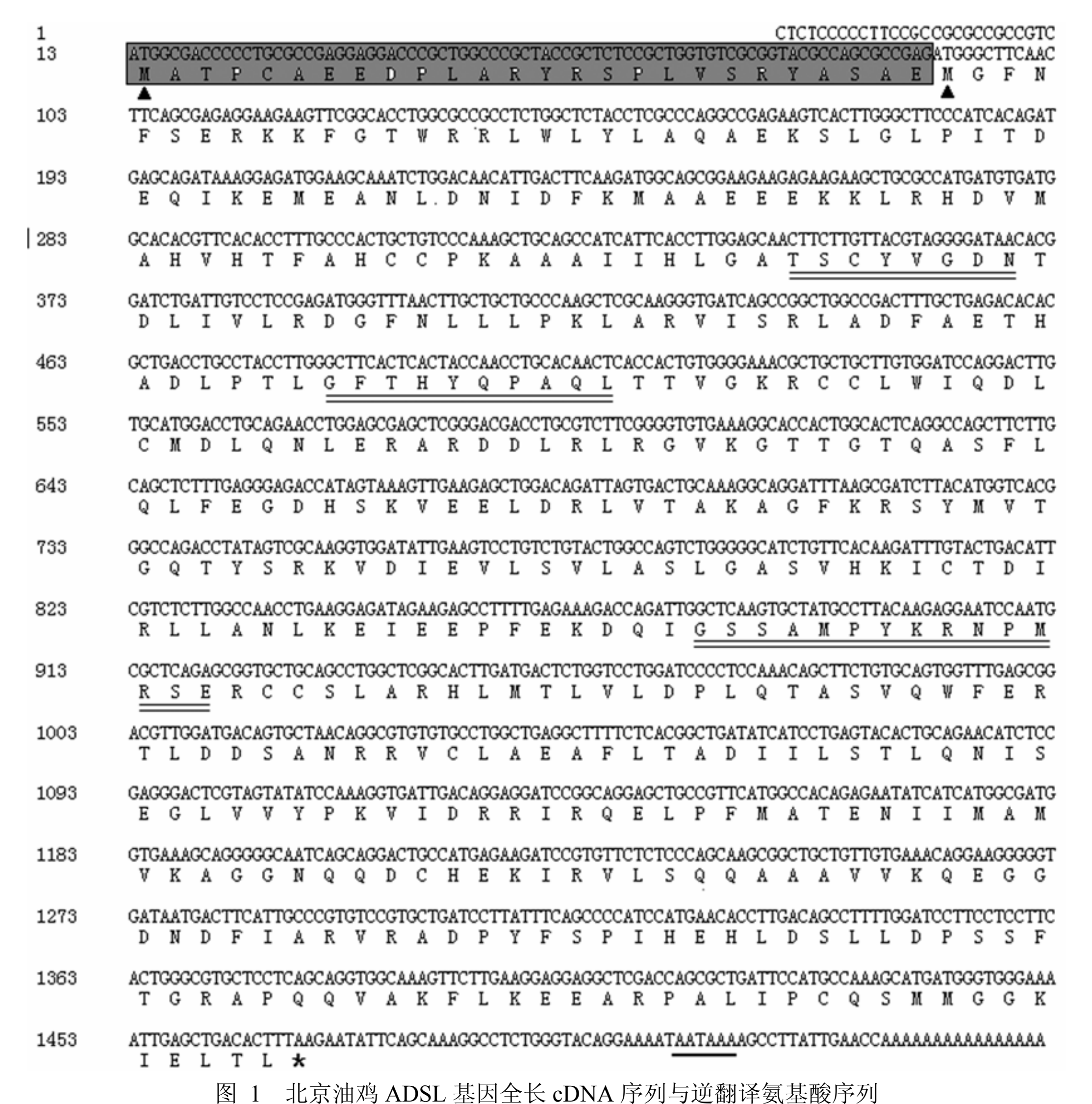


图 1　北京油鸡 ADSL 基因全长 cDNA 序列与逆翻译氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide sequence and predicted protein product of the full-length *ADSL* cDNA for the Beijing fatty chicken

N 末段与先前研究比较增加的 26 个氨基酸用黑框标出，两个翻译起始位点用三角号标出，延胡索酸超家族三个保守区使用双下划线标注，星号指终止密码子，转录终止信号 AATAAA 用单下划线标出。

The 26 amino acids increased at the N-terminal of the protein sequence are shown in shaded boxes. Alternative initial codons M1 and M2 are shown in triangles. The three highly conserved regions within the fumarase superfamily are double underlined. The asterisk indicates the termination codon, and the polyadenylation signal is underlined.

区域具有 72.65%的 GC 含量，这都与管家基因的特征相一致（图 2），这与 Wong et al(1995)和 Marie et al(2002)对大鼠、人类的 ADSL 基因启动子区的研究结果十分相似。

位于北京油鸡 5′侧翼调控区-27 号碱基发生 C→T 突变，存在于所有研究的北京油鸡个体中(N=5)，频率为 1。该突变使得本来不是核呼吸因子-2（NRF-2）结合位点的 CTCC 突变为 NRF-2 结合位点 CTTC。使得北京油鸡在-19 与-27 位置上具有两个相临的顺式转录调控因子－两个潜在的 NRF-2 结合位点，在人的相同位置也具有两个 NRF-2 因子结合位点，北京油鸡、GenBank 以及人类野生型、突变型 ADSL 基因 5′调控区比较见图 4。Marie et al(2002)等通过定点诱变研究，认为人类 5′侧翼调控区的两个 NRF-2 因子在调控 ADSL 基因功能方面具有重要作用。而且这两个 NRF-2 因子与鸡 ADSL 基因的两个 NRF-2 因子位置相同，所以我们认为鸡的这两个 NRF-2 因子也可能在调控 ADSL 基因功能方面发挥重要作用。

## 2.3　不同物种间 ADSL 氨基酸序列比对分析

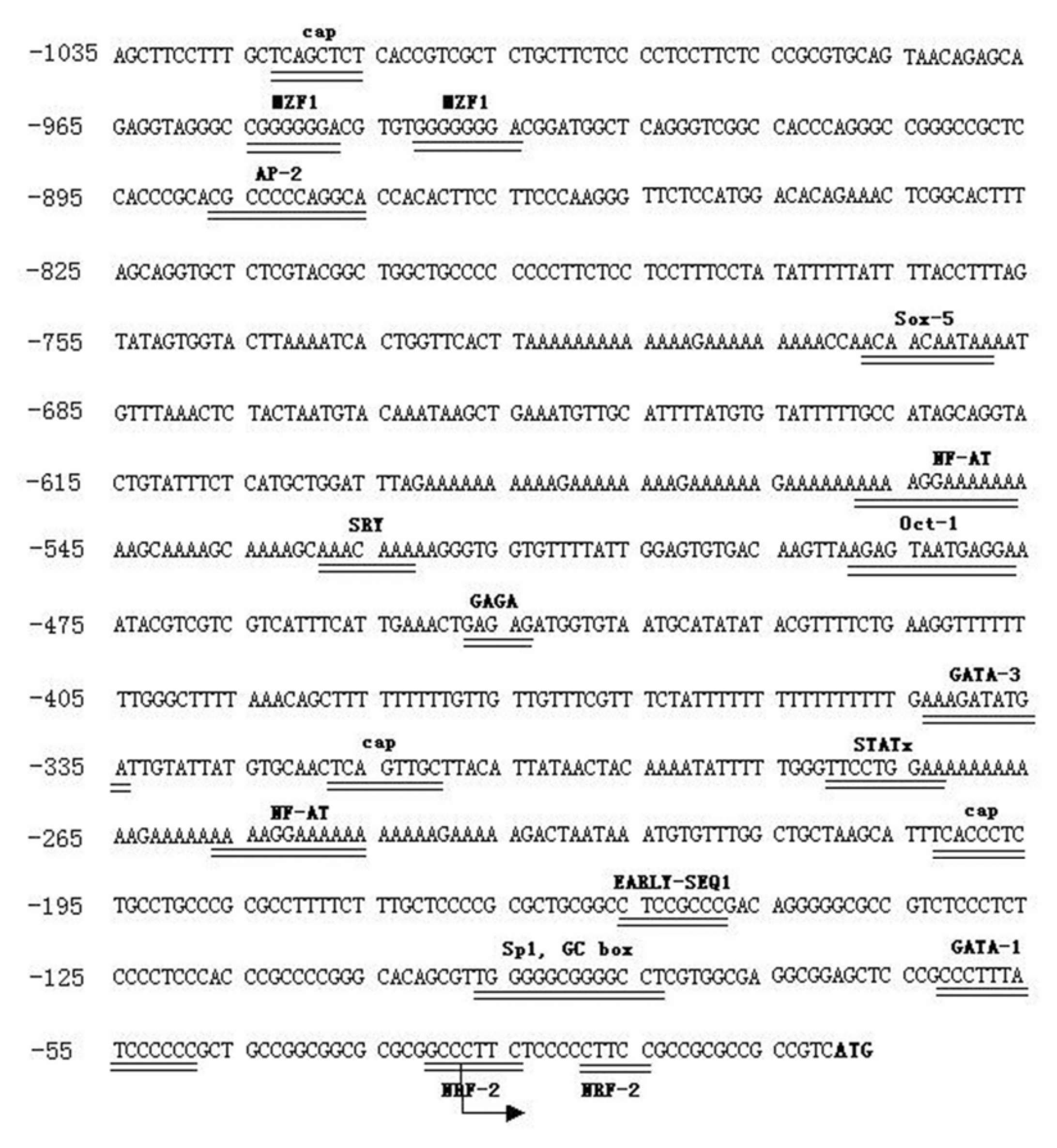



图 2　北京油鸡 ADSL 基因 5´调控区序列及启动子调控元件预测

Fig. 2　Sequence of the 5´flanking region of the Beijing fatty chicken *ADSL* gene and prediction of promoters

起始密码子 ATG 黑体表示，碱基根据起始密码子进行编号，箭头指示转录起始位点，潜在的核因子结合位点用双下划线标注，两个相邻的 NRF-2 结合位点位于-19 与-28。

Bases are numbered by reference to the ATP codon, which is in bold. The arrow indicates the start point of the initiation of transcription. Potential binding sites for nuclear factors are double underlined. The tandem NRF-2 binding sites are based in -19 and -28.

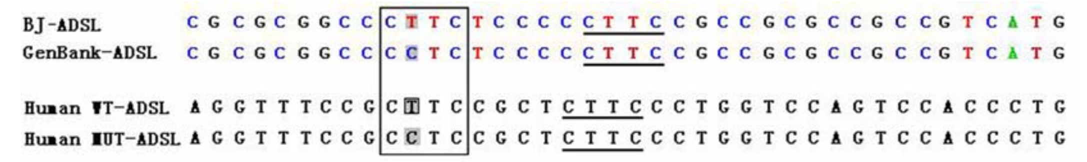



图 3　北京油鸡、GenBank 以及人类野生型、突变型 ADSL 基因 5′ 调控区序列比较

Fig. 3　Comparisions of the ADSL 5´flanking region between Beijing fatty chicken, GenBank, wild and mutation type of human beings

突变碱基用阴影标出，-19 与-28 位置 NRF-2 因子结合位点分别使用框与下划线标出。

The mutation site was shown in shaded boxes.NRF-2 binding sites in -19 and -28 are framed and underlined respectively.

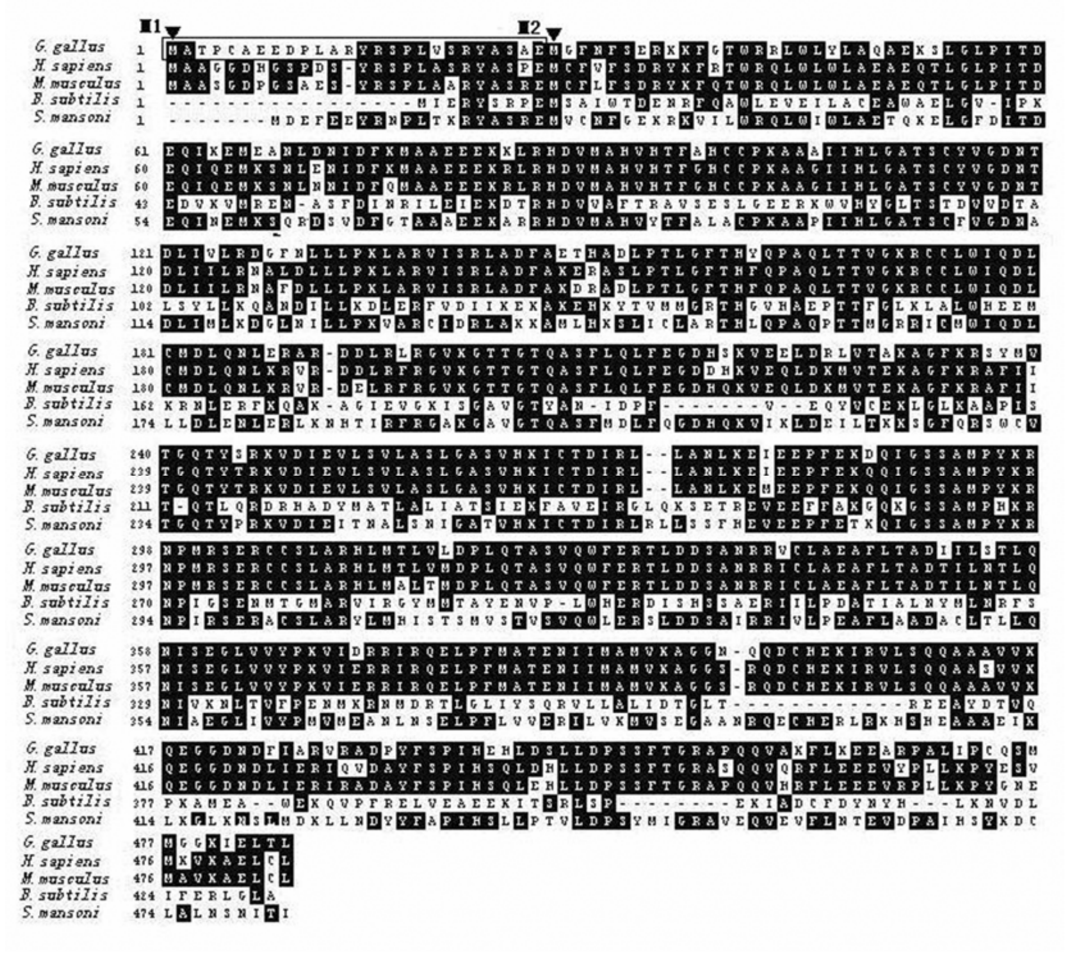



图 4　5 个物种间 ADSL 氨基酸序列的多重序列比对

Fig. 4　Comparison of the ADSL amino acid sequences from five species

北京油鸡与人类、小鼠、芽孢杆菌、曼氏血吸虫 ADSL 氨基酸序列的多重序列比对, N-末端增加的 26 个氨基酸残基用绿框标出，M1 与 M2 分别为本实验与先前起始翻译位点。

Comparisons of translated adenylosuccinate lyase peptide sequence between Beijing fatty chicken (*Gallus gallus*), human (*Homo sapiens*), murine(*Mus musculus*), *Bacillus subtilis* and *Schistosoma mansoni*. These 26 amino acid residues of N-terminus are lined out by frame,M1 and M2 are the initiative codes.

对北京油鸡与人类(*Homo sapiens*)、小鼠(*Mus musculus*)、芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、曼氏血吸虫（*Schistosoma mansoni*）ADSL 进行多重序列比对分析结果表明，北京油鸡 ADSL 基因与人类、鼠类、鱼类及许多菌类都具有很高的序列同源性，但人类、大鼠的序列比以前研究的鸡 ADSL 氨基酸序列多 26 个氨基酸，通过我们对北京油鸡全长 ADSL 基因的 cDNA 序列研究结果证实，在鸡 ADSL 基因 5′ 端在过去认为的起始密码子(M2)前面具有另外一个起始密码子(M1)。作者认为鸡种 ADSL 基因应

该从前面的起始密码子(M1)起始翻译，而且在标准实验条件下，从第二个起始密码子(M2)翻译的蛋白质是不溶性的而且活力不强或者没有活力。

## 2.4　北京油鸡 ADSL 基因体内表达情况

利用 RT-PCR 技术来检测北京油鸡 ADSL 基因在体内的表达情况。利用 GAPDH 作为参照来调整不同组织和器官的 cDNA 模板量，以保证 33 个 PCR 循环之后 GAPDH 扩增产物量保持一致。在同等模板的前提下，用特异引物（ADSL F1，ADSL R1）对样品进行扩增，检测北京油鸡 ADSL 基因的表达情况。

ADSL 在包括心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌和胸肌等 8 种器官或组织中表达情况见图 5。ADSL8 种组织器官中都有不同程度的表达，其中表达最多的是胸肌，其次是肝脏、脾、肾和腿肌，而心、肺和脑中表达量较低。

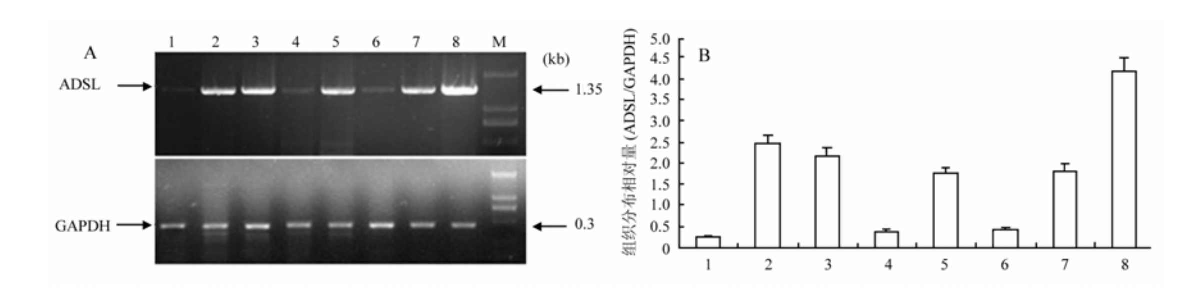



图 5　北京油鸡 ADSL 在 8 种组织中的差异表达分布图

Fig. 5　Differential expression of the Beijing fatty chicken ADSL gene in 8 tissues

A：北京油鸡 ADSL 在 8 种组织中的差异表达，内参 GAPDH 在 8 种组织的扩增产物作对照，M 为 DNA marker DL2000；B：ADSL 基因在 8 种组织差异表达量的比较。1：心，2：肝，3：脾，4：肺，5：肾，6：脑，7：腿肌，8：胸肌。

A: Expression of ADSL in a panel of tissues from Beijing fatty chicken, GAPDH was used as an internal standard to adjust the template concentration for the 8 tissues.lane, M: marker DL2000；B：Comparative levels of expression of ADSL in 8 tissues. 1: Heart; 2: Liver; 3: Spleen; 4: Lung; 5: Kidney; 6: Brain; 7: Leg muscle; 8: Chest muscle.

## 2.5　重组北京油鸡 ADSL 的表达及 SDS-PAGE

SDS-PAGE 结果表明，北京油鸡 ADSL 融合表达载体 pGEX-ADSL 菌株经 IPTG 诱导后，在分子量 80.5kD 处有一条特异蛋白条带（图 6）。未经诱导的菌株无此蛋白带，含空载体的菌株经 IPTG 诱导后也没有此蛋白带，未经诱导的 pGEX-ADSL 菌株表达了此蛋白，但其含量为总蛋白含量的 3.4%。随着 IPTG 诱导时间的延长，该特异蛋白带的表达量相应增加，5h 表达量最高，占所有蛋白总表达量的 26.9%，诱导 3 h 后融合蛋白表达量差异不大，可见 1 mmol/L IPTG 诱导表达 3 h 后即可获得 pGEX-ADSL 良好的表达。pGEX-ADSL 菌株在宿主菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）特异表达了重组蛋白-ADSL，融合蛋白的分子量约为 80.5 kD,与预期的分子量大小基本一致（GST 26 kD 与北京油鸡 ADSL 54.5 融合）。

## 2.6　北京油鸡 pGEX-ADSL 融合蛋白的可溶性检测及纯化

收集诱导表达菌进行超声波破碎，取上清与沉淀进行 SDS-PAGE 电泳，发现该融合蛋白在宿主菌 BL21（DE3）中基本以包涵体形式存在（图 7）。通过一系列表达条件的优化，对可溶性融合蛋白含量进行分析，结果表明随诱导温度的降低、IPTG 浓度的减少及诱导时间的相对缩短，可溶性蛋白占总蛋白的百分比逐渐增加。采用诱导条件为 30℃，0.3 mmol/L IPTG 诱导 3 h 时，表达产物中 GST-ADAL 可溶性蛋白占总蛋白含量的 9.8%，上清经 Glutathione Sepharase 4B 凝胶亲和纯化，发现 80.5、54.5 和 26 kD 处有条带出现，推测可能是纯化过程中融合蛋白有断裂，断为 ADSL（54.5kD）和 GST 蛋白（26kD）两部分，也有可能是融合蛋白在 BL21 菌株中可以分开独立表达，纯化后 3 条蛋白总量经薄层层析扫描分析占总蛋白量的 92.6%。

## 2.7　Western blot 检测重组融合蛋白

将纯化得到的融合蛋白 pGEX-ADSL 进行 Western blot 检测，利用 GST 单克隆抗体检测 pGEX-ADSL 重组融合蛋白的表达情况。结果显示，纯化的北京油鸡 pGEX-ADSL 重组融合蛋白能特异性结合 GST 单克隆抗体，融合蛋白 pGEX-ADSL 在 PVDF 膜上呈现两条显色带，分子量分别为 80.5 和 26kD，推测 80.5kD 应为 pGEX-ADSL 融合蛋白，26 kD 蛋白条带为纯化过程中断裂下来的蛋白

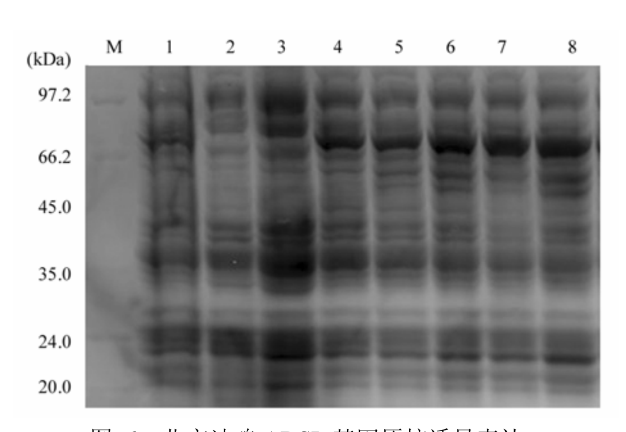



图 6 北京油鸡 ADSL 基因原核诱导表达

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant pGEX-ADSL fusion proteins expressed in the *Escherichia coli* BL21(DE3)

M 为蛋白质分子量标记；1 为 BL21 菌液表达产物；2，3 分别为未诱导和 IPTG 诱导表达 pGEX-4T-1 菌株表达产物；4，5，6，7，8 分别为 pGEX-ADSL1(54.5kDa)诱导 1、2、3、4 和 5h 效果图。

Lane M, protein molecular weight marker; Lanes 1 are the total proteins of BL21; Lanes 2 and 3, total proteins of BL21 containing pGEX-4T-1 without IPTG induction and induction; Lanes 4-8, total proteins of BL21 containing ADSL on 1, 2, 3, 4 and 5h after induction with IPTG.

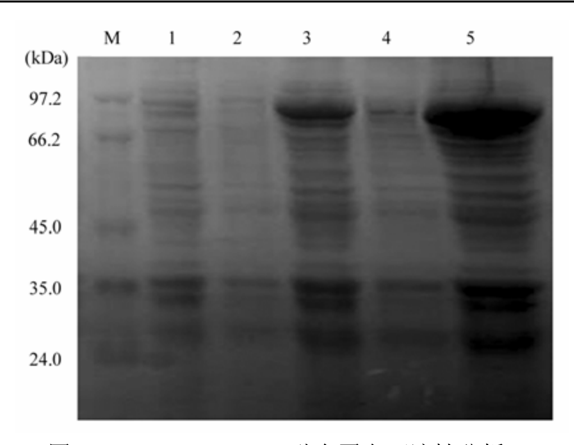



图 7 pEGX-4T-ADSL 融合蛋白可溶性分析

Fig. 7 Soluble analysis of pEGX-4T-ADSL fusion protein

M 为蛋白质分子量标记，1 为未诱导 pEGX-4T-ADSL 融合蛋白表达产物，2 为诱导表达 2h 后上清，3 为诱导表达 2h 后沉淀，4 为诱导表达 5 h 后上清，5 为诱导表达 5h 后沉淀。

M,protein molecular weight marker; 1, expression product of pEGX-4T-ADSL by non-induced cell; 2, Expression product supernatant of pEGX-4T-ADSL induced 2 h; 3, expression product sediment of pEGX-4T-ADSL induced 2 h; 4, expression product supernatant of pEGX-4T-ADSL induced 5 h; 5, expression product sediment of pEGX-4T-ADSL induced 5h.

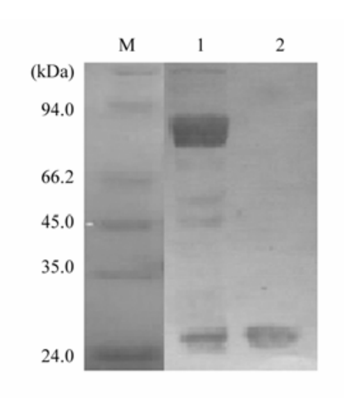



图 8 Western blot 鉴定 pGEX-ADSL 重组融合蛋白的表达

Fig. 8 Western blot analysis of the expression of recombinant fusion protein pGEX-ADSL in BL21

1 为纯化 pGEX-ADSL 融合蛋白 Western Blot 检测结果；2 为 GST 对照蛋白 Western Blot 检测结果。

1 lysates from recombinant fusion protein pGEX-ADSL; 2 lysates from GST positive control.

GST，此结果与 SDS-PAGE 电泳结果一致（图 8）。

### 2.8 北京油鸡 ADSL 的三级结构分析

根据延胡索酸超家族蛋白质数据文件 1c3c，1dof,1jsw 和 1auw 为最初模型，在 Swiss-Model 蛋白质模型服务器上利用 Promod II 程序，构建北京油鸡 ADSL 的三级结构模型(图 9)，此模型将使得鸡 ADSL 单体活性位点和四聚体装配的研究更加简单化。每个 ADSL 酶亚基具有三个结构域：由 1－111 号氨基酸残基组成 1 区（Domain I）和由 367－485 号氨基酸残基组成 3 区(Domain III)位于 ADSL 酶亚基的两端；二区由 112—366 号氨基酸残基组成。1 区是由 1－6 号 α 螺旋构成的完全的 α 螺旋结构，可能的催化残基 His87 位于 4 号 α 螺旋与 5 号 α 螺旋之间。2 区(Domain II)由 5 条长的 α 螺旋组成，连接 1 区与 3 区。3 区类似于 1 区也是由多条 α 螺旋构成的完全的 α 螺旋结构。

## 3 讨 论

### 3.1 全长 ADSL 基因 cDNA 序列及其编码氨基酸序列分析

有关人类 ADSL 基因是从 M1 还是 M2 翻译也曾经存在过争议，Stanislav et al (2000)在 *Escherichia coli* 中克隆并表达了人类 ADSL 基因，并发现：从 M1 起始翻译的蛋白质是可溶的，稳定的，并且具有 ADSL 酶活力；而从 M2 起始翻译的蛋白质是不溶的，不具有 ADSL 酶活力。这也许说明 N-末端的 26 个氨基酸残基对于酶的活性并不是至关重要的，但对酶结构稳定性具有重要作用。鸡类 ADSL 酶氨基酸残基在此位置上与大鼠(Wong et al, 1995)，人类(Marie et al, 2002)与 ADSL 酶高度的序列同源性也强有力地支持了鸡类 ADSL 基因应该

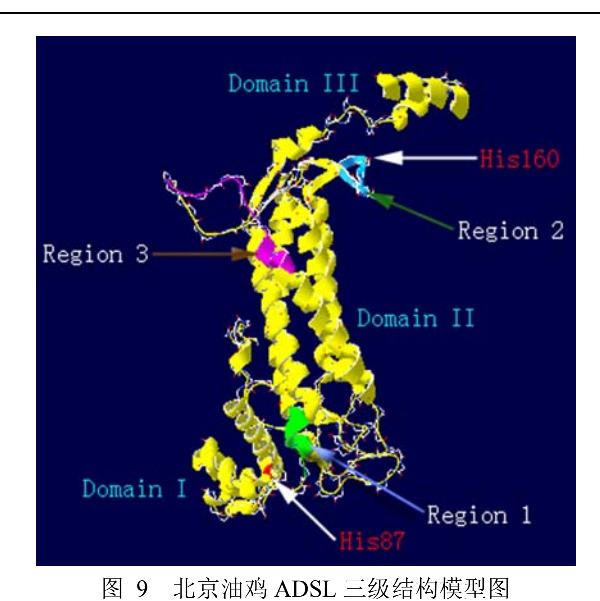



图 9　北京油鸡 ADSL 三级结构模型图

Fig. 9　Ribbon diagram of the model structure of monomer of Beijing fatty chicken ADSL

三个结构域 I、II 和 III 分别位于模型图的左下、中间和右上方，三个保守区用不同的颜色表示出来。

Domain I, II, and III are located respectively, at the bottom left, middle and top right of this drawing. The three conserved regions are drawn in different colors.

从第一个起始密码子 M1 起始翻译。如此以来，鸡的 ADSL 酶具有 485 个氨基酸残基，而与人类和大鼠所具有 484 个氨基酸残基一致。

### 3.2　ADSL 基因 5′侧翼调控区的研究

位于北京油鸡 5′侧翼调控区-28 号碱基发生 C→T 突变，使得本来不是 NRF-2（核呼吸因子 2）结合位点的 CTCC 突变为 NRF-2 结合位点 CTTC，而且在-19 处具有另外一个潜在的 NRF-2 结合位点。在人类 ADSL 基因 5′侧翼调控区靠近起始密码子（ATG）处也具有两个类似相邻的 NRF-2 结合位点。Marie et al (1999) 在对一名 ADSL 缺陷病人的研究发现，其第一个 NRF-2 结合位点发生了突变（CTTC→CTCC）。他认为：①这两个潜在的 NRF-2 结合位点的突变在很大程度上会引起 ADSL 缺陷；②NRF-2 结合位点在嘌呤核苷酸生物合成途径基因调控上起到重要作用。

本研究证实的-28 号碱基发生 C→T 突变也恰好位于北京油鸡 5′侧翼调控区第一个 NRF-2 结合位点，这与 Marie 研究的人类 ADSL 基因调控区第一个 NRF-2 结合位点发生了突变的位置相似。所以，如果依 GenBank 文件 NW_001471513 相关序列为野生型，那么该突变使北京油鸡 5′侧翼调控区本来不是 NRF-2 结合位点突变为 NRF-2 结合位点，可能会增强北京油鸡体内 ADSL 基因的转录；如果所研究北京油鸡 5′侧翼调控区为野生型，那么 GenBank 上所研究的鸡种是否存在人类那样由于第一个 NRF-2 结合位点的突变而造成的 ADSL 缺陷，有待于深入的研究加以证实。

### 3.3　ADSL 基因功能分析

ADSL 是双功能酶，催化嘌呤核苷酸的从头合成与嘌呤核苷酸循环，运用一种基本酸-碱机制，经过 β-终止作用生成延胡索酸。通过与枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）比对分析，北京油鸡 ADSL 酶 His87 和 His160 起到这种基本酸-碱机制。北京油鸡 ADSL 基因的二、三级结构与延胡索酸超家族其它成员非常相似。延胡索酸家族三个高度保守的区域(Region 1,2 和 3)在空间中是相互分开的而且相距较远，所以他们不可能参与形成一个活性位点。而且可能的催化碱基 His87 和 His160 在空间上也被 2 区的 α 螺旋相互分开。每个 ADSL 四聚体具有四个活性中心，并且每个活性中心由三个不同的亚基组成，其中一个亚基提供 His160，另一个提供 His87 和 His108(结合 AMP 底物)，Glu303 与 Lys297(结合底物)来自第三个亚基。催化碱基 His160 与 Glu303 形成电荷中继碱基对,帮助从底物中转移一个质子，通过多重序列比对分析发现，这两个碱基在所有已研究物种的 ADSL 酶中是相当保守的。Gln242 与 Asn298 两氨基酸残基形成氢键与两底物 SAICAR 和延胡索酸盐相互作用(Toth et al, 2000)，两个残基在所有研究物种的 ADSL 酶中是相当保守的，但只有 Asn298 在所有的延胡索酸超家族成员中保守，而 Gln242 并不是特别保守。

### 3.4　ADSL 组织特异性表达

对于鸡 ADSL 基因的组织表达的研究国内外未见报道。本研究发现北京油鸡 ADSL 基因在所研究心、肝、脾、肺、肾、脑、腿肌与胸肌中皆有不同程度的表达，而在胸肌中表达最多，肝脏、脾脏、肾与腿肌也有较多的表达量，而心、肺与脑表达量较少。我们可以看出 ADSL 与体内能量代谢以及鸡肉中风味特性物质肌苷酸的分布有一定的相关性，因此通过研究 ADSL 基因对研究能量代谢与北京油鸡的风味特性具有十分重要的意义。

### 3.5　pGEX-ADSL 融合蛋白的表达与活性鉴定

我们根据 pGEX-4T-1 载体的多克隆位点设计引物，构建表达质粒 pGEX-ADSL 转化 BL21 菌株，在 30℃和 37℃条件下经 IPTG 诱导表达融合蛋白

37℃诱导 5h 表达量可达到 26.9%，但与诱导 3h 后融合蛋白表达量差异不大，可见 1%IPTG 诱导表达 3h 后即可获得 pGEX-ADSL 良好的表达。然而 37℃诱导表达产物主要以包涵体形式为主，影响目的蛋白的纯化与蛋白活性。通过一系列诱导条件优化，结果发现 30℃诱导 3h，表达产物主要以可溶性状态存在，可达 9.8%，通过凝胶亲和层析，纯化蛋白可占总蛋白的92.8%经过 GST 抗体与纯化融合蛋白进行 Western blot 检测，证明所表达及纯化的蛋白就是目的蛋白，将为其进一步的生物活性的广泛研究鉴定基础。

## 参考文献:


Blackburn H, Lebbie SHB, Van der Zijpp AJ. 1998. Animal genetic resources and sustainable development[A]. 6WCGALP/FAO Symposium (Volume 28) (C). Armidale, Australia.

Bulock KG, Beardsley GP, Anderson KS. 2002. The kinetic mechanism of the human bifunctional enzyme ADSL (5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5′-monophosphate cyclohydrolase) a surprising lack of substrate channeling[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(25): 22168-22174.

Castro M, Perez-Cerda C, Merinero B, García MJ, Bernar J, Nagel AG, Torres J, Bermúdez M, Garavito P, Marie S, Vincent MF, Van den Berghe G, Ugarte M. 2002. Screening for adenylosuccinate lyase deficiency: clinical, biochemical and molecular findings in four patients[J]. *Neuropediatrics*, **33**(4): 186-189.

Chen GH, Hou SS, Wu XS. 2000. Comparision between inosinic acid content of muscle in Chinese native chickens[J]. *Acta Veterinariaet Zootechnia Sinica*, **31**（3）：211-215. [陈国宏，侯水生，吴信生. 2000. 中国部分地方鸡肌肉肌苷酸含量研究. 畜牧兽医学报，**31**（3）：211-215.]

Chen JL, Zhao GP, Zheng MQ, Wen J**.** 2002. Comparison of fat deposition and inosinic acid content between the growth-rapid broiler and Chinese native chicken[J]. *China Poultry*, **24**(8): 16-18. [陈继兰，赵桂苹，郑麦青，文 杰. 2002. 快速与慢速肉鸡脂肪生长与肌苷酸含量的比较.中国家禽，**24**(8): 16-18.]

Jaeken J, Van den Berghe G. 1984. An infantile autistic syndrome characterized by the presence of succinylpurines in body fluids[J]. *Lancet*, **2**: 1058-1061.

Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJE. 2000. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM[J]. *J Mol Biol*, **299**(2): 499-520.

Marie S, Cuppens H, Heuterspreute M, Jaspers M, Tola EZ, Gu XX, Legius E, Vincent MF, Jaeken J, Cassiman JJ, Van den Berghe G. 1999. Mutation analysis in adenylosuccinate lyase deficiency: eight novel mutations in the re-evaluate full ADSL coding sequence[J]. *Human Mutation*, **13**: 197-202.

Marie S, Race V, Nassogne MC, Vincent MF, Van den Berghe G. 2002. Mutation of a nuclear respiratory factor binding site in the 5′untranslated region of the ADSL gene in three patients with adenylosuccinate lyase deficiency[J]. *Am J Hum Genet*, **71**: 14-21.

Rost B. 1996. PHD: prediction one-dimensional protein structure by profile based neural networks[J]. *Methods Enzymol*, **266**: 525-539.

Smith DB, Johnson KS. 1988. Single-step purification of polypeptide expressed in *Escherichia coli* as fusion with flutathione S-transforase[J]. *Gene*, **67**: 31.

Stanislav K, Hana H, Blanka S, Jakub K, Marie Z, Ivan S. 2000. Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full–length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients[J]. *Human Molecular Genetics*, **10**: 1501-1513.

Toth EA, Yeates TO. 2000. The structure of adenylosuccinate lyase, an eczyme with dual activity in the de novo purine biosynthetic pathway[J]. *Structure*, **8**: 163-174.

Van den Bergh F, Vincent MF, Jaeken J, Van den Berghe G. 1993. Residual adenylosuccinase activities in fibroblasts of adenylosuccinase-deficient children: parallel deficiency with adenylosuccinate and succinyl-AICAR in profoundly retarded patients and non-parallel deficiency in a mildly retarded girl[J]. *J Inherit Mtab Dis*, **16**: 415-424.

Van den Berghe G, Vincent M F, Jaeken J. 1997. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency[J]. *J Inherit Metab Dis*, **20**(2): 193- 202.

Vergis JM, Bulock KG, Fleming KG, Beardsley GP. 2001. Human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/inosine 5′-monophosphate cyclohydrolase. A bifunctional protein requiring dimerization for transformylase activity but not for cyclohydrolase activity[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(11): 7727-7733.

Wong LJ, O'Brien WE. 1995. Characterization of the cDNA and the gene encoding murine adenylosuccinate lyase[J]. *Genomics*, **28**(2): 341-343.